บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ

Nutrient agar slant

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bacto agar	15	กรัม
NaCl	5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเมื่อยังไม่นำมาใช้

3.1.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

อาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium)

สูตรที่ 1 (MG Halpern,1981)

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สูตรที่ 2 (Sadanobu และคณะ,1975)

KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$MnSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมกลูโคส 5 กรัม และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 20 กรัม ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 ละลายส่วนประกอบของอาหารให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 และนำไป autoclave

3.1.3 การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ กากถั่วเหลือง, กากเมล็ดทานตะวัน, กากมะพร้าว, วีทกลูเตน และคอร์นกลูเตน โดยเตรียมวัตถุดิบเป็น 2 วิธีดังนี้

วิธีที่ 1 การผ่านความร้อนภายใต้ความดันสูง โดยชั่งวัตถุดิบ 12 กรัม นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใสไปใช้

วิธีที่ 2 การย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด ชั่งวัตถุดิบ 12 กรัมใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล จำนวน 40 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 80 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล และนำมาเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการนำมาใช้

3.1.4 <u>สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน</u> โดยวิธีของลอรี (Lowry และคณะ, 1951)

<u>สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์</u> ประกอบด้วยสารละลาย A สารละลาย B และสารละลาย C

สารละลาย A ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม นำไปละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B ชั่งคอปเปอร์(II)ซัลเฟต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C ชั่งโพแตสเซียมทาร์เทรต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A 100 มิลลิลิตร สารละลาย B 1 มิลลิลิตรและสารละลาย C 1 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำมาใช้

<u>สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์</u> (Phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดท 12.5 กรัม น้ำกลั่น 550 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ 25 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร กลั่น (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ 10 ชั่วโมง และเติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มีมากเกินพอเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น ก่อนที่จะนำมาใช้ควรเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

<u>สารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u> (Standard Protein solution)

ละลาย Bovine serum albumine (BSA) เกรด V จำนวน 10 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.1.5 <u>สารละลายสำหรับหาโปรตีเอสแอคติวิตี</u>

<u>สารละลายบัฟเฟอร์ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.1โมลาร์ pH 7.6, 8.5 และ 9.0</u>

ละลายทรีส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน (Tris(hydroxy-

methyl)-aminomethane) 12.12 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.6 ,8.5 และ 9.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

<u>สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.5 และ 8.0</u>

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 53.65 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 27.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1ลิตร เป็นสาร stock solution ผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

pH	NaH_2PO_4 (ml)	Na_2HPO_4 (ml)
7.5	80	420
8.0	26.5	473.5

เติมน้ำกลั่นลงในบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร

<u>สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 9.5,10.0 และ 10.5</u>

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บเป็น stock solution ผสมสารละลายของโซเดียมคาร์บอเนตและโซเดียมไบคาร์บอเนต อัตราส่วนดังต่อไปนี้

pH	Na_2CO_3 (ml)	$NaHCO_3$ (ml)
9.5	65	185
10.0	137	112.5
10.5	202.5	47.5

เติมน้ำกลั่นลงในบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร นำไปวัด pH

<u>สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 11.0</u>

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 10.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

<u>สารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6</u>

ชั่งอิมมิดาโซล 6.808 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตรและปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.6

สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ pH 10.5

ชั่งเคซีนฮาร์มมาสเตน 0.5 กรัม ละลายในสารละลาย คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งเคซีนละลายหมด เก็บรักษาในตู้เย็น

สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 เปอร์เซนต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำมาใช้

3.1.6 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl(Leonard,1987)

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์

ชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนช่วยในการละลาย

สารละลายอินดิเคเตอร์

ชั่งเมธิลเรด 0.2 กรัม และ เมธิลลีนบลู 0.1 กรัม นำไปละลายในเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

3.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

ใช้เข็ม (loop) เขี่ยเชื้อจาก stock แล้ว streak ลงบน Nutrient Agar (NA) Slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มที่ (ประมาณ 18 ชั่วโมง) ปิดจุกด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นานประมาณ 2-3 เดือน

3.2.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุ Nutrient Broth ประมาณ 24 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญ แล้วผสมกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ เทปิดทับผิวหน้า 1-2 เซนติเมตร

ปิดจุกด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นานประมาณ 1 ปี

3.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ

3.3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA-slant 1-2 loop ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.5

3.3.2 การวัดการเจริญของเชื้อ

ใช้ปิเปตที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง และใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยค่าที่วัดได้ไม่ควรเกิน 0.5 (ถ้าเกินควรทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น)

3.4 การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมตามข้อ 3.3.1 ลงในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 และ 2 ที่มีส่วนประกอบดังในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวัด การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH เปรียบเทียบและคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.5 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

เก็บตัวอย่างมาเหวี่ยงตกตะกอนแยกเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสมาหา

แอคติวิตีโดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ 0.9 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นจากอ่างน้ำอุ่นและแช่ลงในอ่างน้ำเย็น หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยเติมสารละลาย 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับ ปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครโมล ที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่สภาวะของการวัดแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกตัวอย่างจะต้องทำหลอดควบคุมด้วย สำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีก่อน และหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 เปอร์เซนต์ของกรดไตรคลอโรอะซีติก จากนั้นจึงค่อยเติมตัวอย่างลงไป นำไปเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงหาได้จากค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างหักออกจากค่าดูดกลืนแสงจากหลอดควบคุมแล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

3.6 <u>การหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส</u>

pH ที่ใช้ในการทดลองคือ 7.5, 8.0, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 และ 11.0 โดยเตรียมบัฟเฟอร์ดังนี้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 8.0 ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.5 และ 9.0 คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต pH 9.5, 10.0, 10.5 และ 11.0

การหา pH ที่เหมาะสมในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสทั้งหมดทำโดยบ่มตัวอย่างกับเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10 เปอร์เซนต์

ของกรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

สำหรับการหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสทำเหมือนกรณีแรกแต่บ่มตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มี EDTA ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ก่อนเป็นเวลา 10 นาทีแล้วจึงนำไปบ่มกับเคซีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆต่อไป

3.7 <u>การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี</u> (Lowry,1959)

ใช้ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมฟีนอลรีเอเจนต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8 <u>การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl</u> (Leonard,1987)

ใช้ตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 1-2 มิลลิลิตร เติมคะตาไลส์ (โพแตสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม) 7 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น Buchi โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร นำเอาขวดที่บรรจุกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดมารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเขียวใส คำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนจากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซนต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{V}$$

A = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

3.9 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.9.1 การหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสม

หาปริมาณของวัตถุดิบเริ่มต้นที่จะใช้โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นตัวศึกษาแปรผันปริมาณดังนี้ 0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเชื้อติดตามการเจริญและการสร้างเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ดีที่สุด

เมื่อคัดเลือกปริมาณที่เหมาะสมได้แล้วทดลองเปรียบเทียบกับวัตถุดิบ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน กากมะพร้าว วีทกลูเตน คอร์นกลูเตน ซึ่งเตรียมแยกเป็น 2 วิธีดังกล่าวในข้อ 3.1.3 และใช้วัตถุดิบเหล่านี้เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4 วัดการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส pH และปริมาณโปรตีน เลือกวัตถุดิบที่ให้ผลของการเจริญและการสร้างเอนไซม์สูง

3.9.2 การใช้วัตถุดิบผสม

ใช้วัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.9.1 และสารสกัดจากยีสต์นำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ทำการเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว

3.9.3 การหาปริมาณวัตถุดิบผสมที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันปริมาณของวัตถุดิบผสมที่คัดเลือกได้จากข้อ

3.9.1 และ 3.9.2 ดังนี้คือ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ วัดการเจริญ แอคติวิตี pH และ ปริมาณโปรตีน

3.10 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.10.1 การหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสม

หาปริมาณของวัตถุดิบเริ่มต้นที่จะใช้โดยใช้กลูโคสเป็นตัวศึกษาโดยแปรผันปริมาณดังนี้ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารโดยมีวัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.9.3 เป็นแหล่งไนโตรเจน วัดการเจริญ แอคติวิตีเอนไซม์และ pH คัดเลือกปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ดีที่สุด

เมื่อคัดเลือกปริมาณที่เหมาะสมได้แล้วทำการทดลองโดยใช้วัตถุดิบต่อไปนี้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส คือ ซิเตรท, กลูตาเมท, ไฮโดรไลเสทของแป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวโพด คัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.10.2 การใช้วัตถุดิบผสม

ใช้วัตถุดิบที่ได้จากข้อ 3.10.1 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ทำการเลี้ยงเชื้อและเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว

3.10.3 การหาปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันปริมาณของวัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.10.1 และ 3.10.2 ดังนี้คือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ วัดการเจริญเชื้อ แอคติวิตีและการเปลี่ยนแปลงของ pH

3.11 การขยายส่วนในการผลิตและหาสภาวะการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อในอาหารโดยมีวัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.9 และ 3.10 เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนตามลำดับ โดยขยายส่วนขึ้นจากการเลี้ยงในขวดขนาด 500 มิลลิลิตรบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 150 มิลลิลิตร เป็นขวดขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่

300 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้อากาศด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส แปรผันจำนวนรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที เปรียบเทียบหาจำนวนรอบในการเขย่าที่ให้ผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์ดีที่สุด เตรียมเอนไซม์ในปริมาณมากเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.12 การเตรียมเอนไซม์ในรูปผงและความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

3.12.1 การเตรียมเอนไซม์ในรูปผง

วิธีที่ 1 ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด 70 เปอร์เซนต์ (472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) โดยค่อยๆเติมทีละน้อย คนเบาๆจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้วจึงนำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 และล้างตะกอนด้วยสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บดเอนไซม์ที่อบแห้งแล้วให้เป็นผง ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ผงที่ได้

วิธีที่ 2 ตกตะกอนด้วยเกลือรีเซเดียมซัลเฟต ทำการตกตะกอนเหมือนกับการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แต่ใช้รีเซเดียมซัลเฟต 30 เปอร์เซนต์แทน

วิธีที่ 3 ตกตะกอนด้วยเอธานอล เตรียมเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการตกตะกอน โดยค่อยเติมเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว คนเบาๆจนกระทั่งเกิดตะกอนสีขาวขุ่น นำไปเหวี่ยงตกตะกอนแยกตะกอนมากรองและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง ทำการบดเอนไซม์ที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักเอนไซม์ผงที่ได้

วิธีที่ 4 ทำให้เข้มข้นด้วยวิธี Ultra-filtration และทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilization นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วมาทำ Ultra-filtrationโดยลดปริมาตรเหลือ 1 ใน 3 โดยกรองผ่านเมมเบรนที่มี molecular weight cut off 10,000 นำส่วนที่ได้จากการทำ Ultra-filtration แล้วไปทำ Lyophilization

จนได้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปผง ชั่งน้ำหนักที่ได้

เปรียบเทียบปริมาณและแอคติวิตีของเอนไซม์ผงที่เตรียมได้จากแต่ละวิธี และคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมเอนไซม์ผง

3.12.2 <u>การทดสอบความสามารถในการเก็บเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่างๆ</u>

เตรียมเอนไซม์ผงโดยวิธีที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อที่ 3.12.1 แบ่งเอนไซม์ที่ได้แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20, 4, 18-22, 30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาหาแอคติวิตีเป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ก่อนที่จะนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ หาค่าแอคติวิตีที่เหลือโดยเทียบเป็นเปอร์เซนต์แอคติวิตีสัมพัทธ์